

ÉLŐ SEJTEK ADHÉZIÓJÁNAK MONITOROZÁSA OPTIKAI BIOSZENZOROKKAL

Orgován Norbert, Beatrix Péter, Bösze Szilvia, Ramsden J. Jeremy, Szabó Bálint, Horváth Róbert

Egy újszerű, nagy áteresztőképességű optikai bioszenzor, az Epic BenchTop (BT) segítségével azt vizsgáltuk, hogyan függ a rákos sejtek kiterülésének kinetikája a integrin-ligandum RGD-motívumok átlagos felületi sűrűségétől (v_{RGD}) [1]. A biológiailag inaktív PLL-g-PEG kopolimer, és az RGD-funkcionalizált PLL-g-PEG-RGD vegyített oldatait használtuk a felületi bevonatok elkészítéséhez, v_{RGD} -t négy nagyságrenden keresztül hangoltuk. Modell sejtvonalként az erősen adherens HeLa rákos sejtvonalat használtuk, a kiterülés kinetikáját az Epic BT bioszenzorral egyedülálló minőségben rögzítettük. A kapott görbéket kinetikai elemzésnek vetettük alá: az adatokat a logisztikus egyenlettel illesztettük meg, hogy meghatározhassuk, hogyan függ a felületi ligandsűrűségtől a sejtkiterülés sebességi állandója (r), illetve a maximális bioszenzor jel ($\Delta\lambda_{\text{max}}$). Eredményeink szerint r nem függ v_{RGD} -tól, átlagos értéke $0.062 \pm 0.004 \text{ min}^{-1}$. Ezzel szemben $\Delta\lambda_{\text{max}}$, ami egyenesen arányos a kiterült sejt átlagos kontaktterületével, növekedett, ahogy v_{RGD} -t növeltük. Ezt a viselkedést egy egyszerű monovalens kötési reakcióval leírva meghatároztuk a PLL-PEG-RGD molekula RGD-motívuma és a sejt integrinjei közötti kölcsönhatás két dimenziós disszociációs állandóját, mely $1753 \mu\text{m}^{-2}$ -nek adódott. Ebből egyszerűen származtatható a kapcsolat 3D-s disszociációs állandója, melynek értéke $\sim 30 \mu\text{M}$. Mindezen eredményehez egyedülálló módon teljesen noninvazív és jelölésmentes kísérleteken keresztül jutottunk.

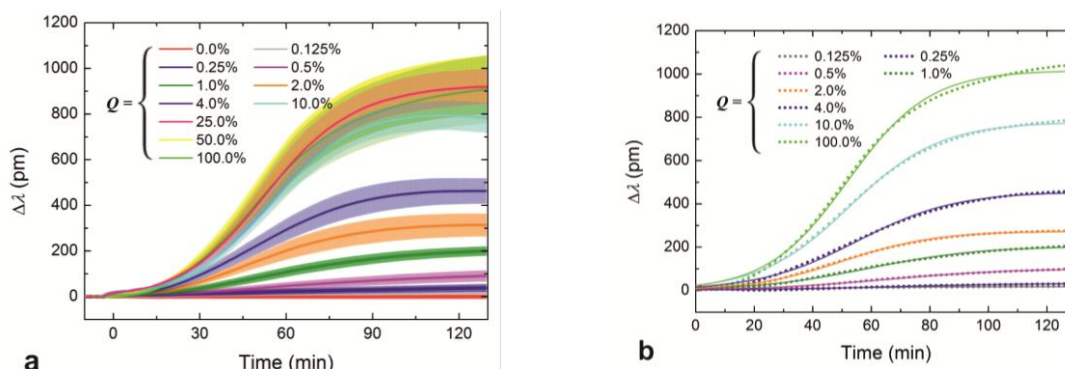


Figure 1 A különböző RGD-sűrűségek mellett kapott adhézión görbék és azok illesztései. (a) AHeLa sejtek Epic BT-vel mért felvett adhézión görbéi. A sejteket felhelyezést követően körülbelül 2 óráig hagytuk szobahőmérsékleten, szérumbmentes tápközegben terülni a PLL-PEG és PLL-PEG-RGD kevert oldatai segítségével előkészített felületeken. A görbék 3-3 kísérlet átlagát és az attól való standard eltérést ábrázolják. (b) Az egyedi adhézión görbék (pontok) és azok illesztései (folytonos vonalak) praktikusán elkülöníthetetlenek egymástól, ami a bioszenzorral rögzített adatok kiemelkedő minőségét mutatja..

[1] Orgován N, Peter B, Bösze S, et al. (2014) Dependence of cancer cell adhesion kinetics on integrin ligand surface density measured by a high-throughput label-free resonant waveguide grating biosensor. Sci Rep

ADHESION AND SPREADING OF LIVING CELLS MONITORED BY OPTICAL BIOSENSORS

Norbert Orgován, Beatrix Péter, Jeremy J. Ramsden, Bálint Szabó, Róbert Horváth

We used a novel high-throughput label-free resonant waveguide grating (RWG) biosensor, the Epic® BenchTop (BT), to determine the dependence of cell spreading kinetics on the average surface density (v_{RGD}) of integrin ligand RGD-motifs. v_{RGD} was tuned over four orders of magnitude by co-adsorbing the biologically inactive PLL-g-PEG and the RGD-functionalized PLL-g-PEG-RGD synthetic copolymers from their mixed solutions onto the sensor surface. Using highly adherent human cervical tumour (HeLa) cells as a model system, cell adhesion kinetic data of unprecedented quality were obtained. Spreading kinetics were fitted with the logistic equation to obtain the spreading rate constant (r) and the maximum biosensor response ($\Delta\lambda_{\text{max}}$), which is assumed to be directly proportional to the maximum spread contact area (A_{max}). r was found to be independent of the surface density of integrin ligands. In contrast, $\Delta\lambda_{\text{max}}$ increased with increasing RGD surface density until saturation at high densities. Interpreting the latter behavior with a simple kinetic mass action model, a heterogeneous (2D) dissociation constant of $1753 \mu\text{m}^{-2}$ (corresponding to a homogeneous (3D) dissociation constant of $\sim 30 \mu\text{M}$) was obtained for the binding between RGD-specific integrins embedded in the cell membrane and PLL-g-PEG-RGD. All of these results were obtained completely noninvasively without using any labels.

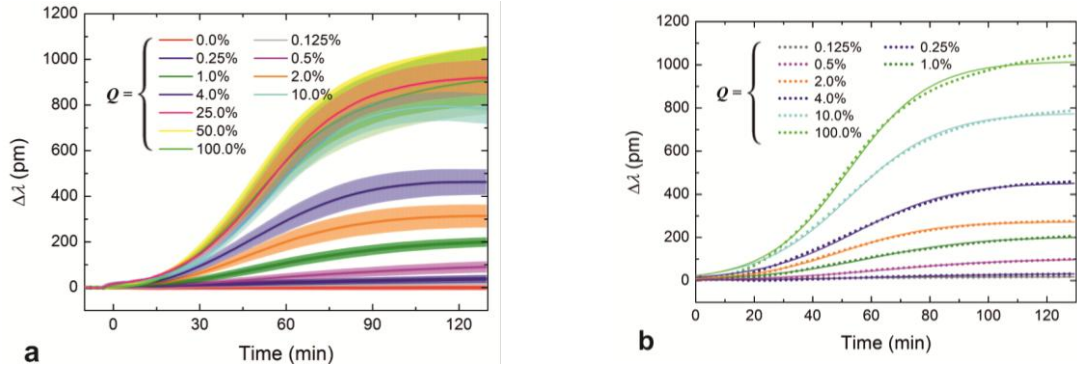


Figure 1 Spreading curves obtained at different RGD densities and their fits. **(a)** Spreading curves of HeLa cells measured using the RWG imager. The surface density of integrin ligand RGD-motifs was fine-tuned by co-adsorbing the generally cell repellent and protein-resistant PLL-g-PEG copolymer and its cell adhesive, functionalized counterpart, PLL-g-PEG-RGD, from their mixed solutions. HeLa cells in serum-free buffer were seeded on the coated sensor surfaces (at epoch $t=0$ min) and their spreading was monitored for approximately 2 h. Measurements were done in triplicate, data are presented as mean \pm standard deviation. **(b)** Individual spreading curves registered by the RWG sensor and their fits (Eq. 5) can be hardly distinguished, which demonstrates the superior quality of the data (only one series of curves is shown, and some data and the corresponding fits have been omitted from this figure to avoid crowding and overlaps). Dots represent data, solid curves are the fits.